

## Efeito antifúngico da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* contra *Candida krusei*

### Antifungal effect of the chloroform phase of *Raphiodon echinus* against *Candida krusei*

Maelle Santos Araújo<sup>1</sup>, Maria Alice Araújo de Medeiros<sup>1\*</sup>, Millena de Souza Alves<sup>1</sup>, Bernadete Santos<sup>1</sup>, Aleson Pereira de Sousa<sup>2</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>2</sup>, Gabriela Lemos de Azevedo Maia<sup>3</sup>, Luciano de Brito Júnior<sup>1</sup>, Raline Mendonça dos Anjos<sup>1</sup>, Veneziano Guedes de Sousa Rêgo<sup>1</sup>, Maria das Graças Veloso Marinho de Almeida<sup>1</sup>, Aline de Farias Diniz<sup>1</sup>, Abrahão Alves de Oliveira Filho<sup>1</sup>

---

#### RESUMO

A utilização de espécies vegetais para a cura de doenças e sintomas remonta ao começo da civilização, desde que o homem começou a usar e a alterar os recursos naturais para seu próprio benefício. Fitoterapia significa etimologicamente “terapia com plantas”, e se define como a ciência que pesquisa a utilização dos produtos de origem vegetal com intuito terapêutico para se prevenir, suavizar ou curar um estado patológico. Neste contexto, a fitoterapia engloba plantas medicinais, extratos e medicamentos fitoterápicos. Diante da importância dos extratos das plantas para o tratamento de infecções, o presente estudo teve como objetivo determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre a técnica de microdiluição em caldo da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* frente as cepas de *Candida krusei*. Para o teste de microdiluição em caldo, a fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* apresentou CIM 50 de 256 µg/mL para as cepas do fungo. Considera-se, portanto, que o produto testado apresenta um efeito antifúngico contra as cepas de *Candida krusei*.

**Palavras-chave:** *Candida krusei*; Fitoterapia; Micologia.

---

#### ABSTRACT

The use of plant species to cure diseases and symptoms dates back to the beginning of civilization, since man began to use and alter natural resources for his own benefit. Phytotherapy etymologically means “therapy with plants”, and is defined as the science that researches the use of products of plant origin with a therapeutic purpose to prevent, soften or cure a pathological state. In this context, phytotherapy encompasses medical plants, extracts and herbal medicines. Given the importance of plant extracts for the treatment of infections, the present study aimed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) on the broth microdilution technique of the chloroform phase of *Raphiodon echinus* against *Candida krusei* strains. For the broth microdilution test, the chloroform phase of *Raphiodon echinus* showed a MIC

---

<sup>1</sup> Universidade Federal de Campina Grande

\*E-mail: medeirosalice22@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal da Paraíba

<sup>3</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco

50 of 256 µg/mL for the fungus strains. Therefore, the tested product is considered to have an antifungal effect against *Candida krusei* strains.

**Keywords:** *Candida krusei*; Phytotherapy; Mycology.

---

## INTRODUÇÃO

A utilização de espécies vegetais para a cura de doenças e sintomas remonta ao começo da civilização, desde que o homem começou a usar e a alterar os recursos naturais para seu próprio benefício (DI STASI, 1996).

Fitoterapia significa etimologicamente “terapia com plantas”, e se define como a ciência que pesquisa a utilização dos produtos de origem vegetal com intuito terapêutico para se precaver, suavizar ou curar um estado patológico. Neste contexto, a fitoterapia engloba plantas medicinais, extratos e medicamentos fitoterápicos (ROSSATO; CHAVES, 2012).

A utilização de plantas no tratamento e na cura de doenças é antiga igualmente como espécie humana, trazendo o conhecimento popular, onde possui grande contribuição para divulgação das propriedades terapêuticas obtidas a partir do uso dessas plantas (LUBIAN *et al.*, 2010). Há pouco tempo, desenvolveram estudos que mostram a existência de plantas com atividades fungicidas. Os extratos e óleos essenciais extraídos de plantas têm grande potencial no controle de microrganismos patogênicos, e muitos deles possuem ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, além da capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas nas plantas nos casos de fungos fitopatogênicos (CHAVES *et al.*, 2018).

Os fungos foram considerados pertencentes ao Reino *Plantae* por muito tempo, e somente a partir de 1969, foram colocados em um grupo à parte chamado Reino *Fungi*. Para distinguir os fungos dos vegetais os seus caracteres essenciais são: não sintetizam clorofila, sua parede celular não possui celulose (com exceção de alguns fungos aquáticos) e não armazenam amido como substância de reserva. Os fungos possuem substância quitinosa na parede e como fonte de reserva armazena glicogênio por isso os assemelham às células animais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Leveduras do gênero *Candida* são frequentemente comensais humanos, mas podem, em situações que normalmente envolvem imunodebilidade, acarretar infecção

conhecida como candidíase em diversos sítios anatômicos (RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009).

Estas micoses podem ser causadas por diferentes espécies. *Candida krusei* é um exemplo das espécies de *Candida* que habitam ocasionar infecção nesses pacientes com sistema imunológico enfraquecido. Essa espécie pode levar a uma doença sistêmica, que afeta uma série de órgãos, tecidos ou que afeta o corpo humano como um todo. Apesar de pouco conhecida, essa espécie merece ênfase, pois, as taxas de mortalidade dos pacientes que desenvolvem infecção sistêmica por *Candida krusei* ficam em torno de 70% (FARIA, 2017).

Diante da importância dos extratos das plantas para o tratamento de infecções, o presente estudo teve como objetivo determinar a concentração inibitória mínima da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* sobre cepas de *Candida krusei*.

## MATERIAL E MÉTODO

A fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* foi cedida pela equipe da professora Dr. Gabriela Lemos de Azevedo Maia - Univasf. Para atingir os testes farmacológicos, a substância foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída em água destilada. A concentração de DMSO foi inferior a 0,1% v / v.

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A atividade antifúngica foi realizada em quatro cepas selecionadas de *Candida krusei* LM 08, LM 13, LM 656, LM 978. Todas as cepas de microorganismos utilizados neste estudo fazem parte da MICOTECA do Laboratório de Micologia/DFP/CCS/UFPB.

A atividade antifúngica foi realizada de acordo com os protocolos descritos por Cleeland e Squires (1991), Hadacek e Greger (2000) e CSLI (2008).

As CIMs do *Raphiodon echinus* foram determinadas contra cepas de *Candida krusei* pela técnica de microdiluição em caldo. Inicialmente, 100 µL de caldo de dextrose Sabouraud foram adicionados aos poços da placa de microdiluição. Em seguida, 100 µL dos produtos da emulsão foram dispensados nos poços da primeira fila. Uma razão de duas concentrações foram obtidas de 1024 µg / mL a 2 µg / mL, de modo que a primeira linha da placa encontrasse a maior concentração e, por último, a menor

concentração. Finalmente, 10 µL do inóculo foram adicionados às cavidades, onde cada coluna de placa se referiu a uma cepa fúngica, em particular.

Paralelamente, foi realizado o controle de viabilidade das cepas testadas, juntamente com o controle de sensibilidade, essas cepas de ação antifúngica consideradas padrões em uso clínico (Nistatina 100 UI / mL). Para verificar a ausência de interferência do solvente nos resultados, um controle foi colocado nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 100 µL de *Raphiodon echinus* e 10 µL da suspensão foi feita.

As placas foram seladas assepticamente e incubadas a 35°C durante 24 - 48 horas. O teste foi realizado em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIMs obtidas nos dois testes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tem-se analisado principalmente no ambiente hospitalar, o aumento de infecções por *Candida* spp resistentes a antifúngicos. Esta resistência tem alta taxa de inviabilidade na terapêutica contra essa infecção (VANDEPUTTE *et al.*, 2005). O uso descomunal destes fármacos propicia o aparecimento de leveduras resistentes, principalmente em pacientes imunossuprimidos, expostos a infecções frequentes (ALVES *et al.*, 2006).

Deste modo, há obrigação do desenvolvimento de novos fármacos de maior eficácia, entre as possibilidades, têm a utilização de fitoterápicos como tratamento alternativo (ANDRADE *et al.*, 2012). O estudo de plantas com propriedades terapêuticas, envolvendo aquelas com atividade antimicrobiana tem evoluído bastante, não apenas por compor um recurso terapêutico alternativo, mas pelas perspectivas de isolar substâncias que apresentem eficácia significativa e menor índice de desvantagens (REDO; RIOS; VILLAR, 1989).

Os resultados da CIM (Concentração Inibitória Mínima) de *Raphiodon echinus* contra as cepas de *Candida krusei* são mostradas na Tabela 1. Para o teste de microdiluição em caldo, a fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* apresentou CIM50 de 256 µg/mL, para as cepas do fungo.

**Tabela 1** - Atividade antifúngica para determinação da CIM da fase clorofórmica do *Raphiodon echinus* contra cepas de *Candida krusei*.

<b>Substância/cepa</b>	<i>Candida krusei</i> <b>LM 08</b>	<i>Candida krusei</i> <b>LM 13</b>	<i>Candida krusei</i> <b>LM 656</b>	<i>Candida krusei</i> <b>LM 978</b>
<b>1024 µg/mL</b>	+	+	+	+
<b>512 µg/mL</b>	+	-	+	+
<b>256 µg/mL</b>	-	-	+	+
<b>128 µg/mL</b>	-	-	-	-
<b>64 µg/mL</b>	-	-	-	-
<b>32 µg/mL</b>	-	-	-	-
<b>16 µg/mL</b>	-	-	-	-
<b>Controle Positivo</b>	+	+	+	+
<b>Controle Negativo</b>	-	-	-	-

(-) Nenhuma inibição (+) Inibição

Fonte: Autorial própria (2022)

Sartoratto *et al.* (2004) sugerem que uma atividade antimicrobiana é classificada como forte quando possuem CIM de até 500 µg/mL, moderada para CIM de 600 a 1500 µg/mL e fraca para CIM acima de 1500 µg/mL.

Sendo assim, de acordo com os resultados da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus*, pode ser considerada como forte inibidor frente às cepas *Candida krusei*.

Um número suficiente de produtos vegetais da região Nordeste expõe substâncias com atividade antifúngica sobre leveduras de *Candida*, podendo operar seletivamente sobre estes microrganismos (MINAMI; OLIVEIRA, 1986; MICHELIN *et al.*, 2005).

A família botânica Lamiaceae, é composta por diferentes espécies de plantas com importância econômica e medicinal. Possui como característica principal, seu aroma bastante definido e fácil de distinguir. Sua utilização comercial é ressaltante, para a indústria farmacêutica e cosmética. Sendo usadas para extração de óleos e chás, é utilizada na culinária, e na aromoterapia (TRINDADE *et al.*, 2016). Muitas espécies da família, em particular as do gênero *Hyptis*, são endêmicas do semiárido nordestino e exibem ampla variabilidade de metabólitos secundários, com ênfase para os óleos essenciais, que têm grande valor junto a diferentes comunidades devido as suas

propriedades terapêuticas (OLIVEIRA, 2011). Outro representante da família Lamiaceae na Caatinga é o gênero *Rhaphiodon*, constituído por uma única espécie, a *Rhaphiodon echinus*, considerada como característica dessa região (DIAS; KIILL, 2007).

Compreendendo o valor do gênero *Rhaphiodon* e a escassez de estudos fitoquímicos e farmacológicos optamos pelo estudo da fase clorofórmica de *Rhaphiodon echinus*, tendendo contribuir com estudos fitoterápicos das mesmas.

## CONCLUSÃO

Devido a análise dos resultados, pode-se observar a considerável atividade antifúngica *Raphiodon echinus* frente as cepas da espécie *Candida krusei*, onde o produto natural testado apresentou um forte efeito antifúngico diante das cepas de origem clínica. Desse modo, é possível a utilização desta substância para futuros tratamentos das doenças causadas pelas leveduras de *Candida krusei*. Destacando a necessidade de mais estudos para detalhar esta atividade farmacológica.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, P. M. *et al.* Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 16, p. 192-196, 2006.
- ANDRADE, M. A. *et al.* Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- CHAVES, M. R. V. *et al.* POTENCIAL FUNGICIDA DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO DA COSTA LESTE DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 2018.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. **Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections**. In: Lorian, V. M. D. *Antibiotic Lab Med*. New York: Willians & Wilkins, 739-788, 1991.
- CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. CLSI document M27-A3, v. 28 n.14, 2008.
- DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 230, 1996.

DIAS, C. T. V.; KIILL, L. H. P. Ecologia da polinização de *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer (Lamiaceae) em Petrolina, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 977-982, 2007.

FARIA, D. R. *Candida krusei: Que fungo é esse?*, 2017. Disponível em: <<https://museudinamicointerdisciplinar.wordpress.com/2017/10/03/candida-krusei-que-fungo-e-esse/>>. Acesso em 12 de ago. 2018.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

LUBIAN, C. T. *et al.* Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 157-162, 2010.

MICHELIN, D. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MINAMI, P. S.; OLIVEIRA, F. Atividade antifúngica de *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, p. 118-122, 1986.

OLIVEIRA, A. D. L. Estudo químico e avaliação biológica do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular)** Universidade Regional do Cariri – URCA, 2011.

REDO, M. C.; RIOS, J. L.; VILLAR, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978–1988. **Phytotherapy Research**, v. 3, n. 4, p. 117-125, 1989.

RÖRIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 225-227, 2009.

ROSSATO, A. E.; CHAVES, T. R. C. Fitoterapia Racional: Aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos, dinâmica utilizada no levantamento das informações que constam neste livro. In: ROSSATO *et al.* (Orgs). **Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos**. v. 1 – Florianópolis: DIOESC, 16-17, 2012.

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. Atheneu, 2004.

TRINDADE, E. L. *et al.* Lamiaceae-levantamento de dados das plantas medicinais recorrentes no estado de Mato Grosso presentes no herbário UFMT campus de Cuiabá-MT. **Biodiversidade**, v. 15, n. 2, 2016.

VANDEPUTTE, P. *et al.* Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4608-4615, 2005.

*Recebido em: 05/07/2022*

*Aprovado em: 12/08/2022*

*Publicado em: 16/08/2022*